# 菇類菌種保存技術

王伯徹[1,*]

[1]食品工業發展研究所 / 南台灣服務中心

[*]通訊作者電子信箱：wbc@firdi.org.tw

## 摘 要

食藥用菇的應用價值高，且其經濟效益更是引人側目，但近來菇農及產業界卻一再反應，其生產的產質和產值日久出現有下降的趨勢。推敲其原因不外乎是，生產核心-—菌種的保存不良，而導致菌種污染、變異或活力衰退，甚至死亡。這些都是業界生產產程中的致命傷，極需針對此一問題做個徹底的研究解決，以防止投資上無謂的經濟損失。

關鍵詞：食藥用菇、菌種、保存

## 緒 言

菇類在分類上是屬於擔子菌及子囊菌之高等眞菌，在農業、醫學、工業等研究範疇中具有相當重要的地位及研究潛力，但是若無法妥善保存菌種，則將導致菌體的變異或退化，使其失去原有優異的遺傳特性，或降低活性甚至死亡，而嚴重影響其經濟效益及研究價值，故知長時間保存菌種時應採取適當之措施以防止變異發生。因此，菌種保存工作在科學發展領域上扮演著舉足輕重的角色。

菇類自古與中國人之食性有著密切的關係，例如香菇、洋菇、草菇、木耳等至今仍爲我國甚至於全世界各國人民所喜愛的食品。就保存與銷售方面而言，菇類因屬眞菌，在培養基上採菌絲培養是最直接簡便之方法，不過因菌體在培養基上極少產生孢子，不適合用冷凍乾燥法長期保存菌種。若是收集子實

體之擔孢子或子囊孢子，雖可利用冷凍乾燥法保存，然因子實體產生之孢子在採收時已曝露在空氣中，尤以野生採集爲然，極易受到污染，故在活化接種時必須採用單孢分離，而且必須相容可孕的兩個品系交配，所以雖然能確保長久保存的成功率，但因操作繁瑣，只有少數學者研究某特定之屬的菇類菌種時，且爲了雜交育種之便才被採用，以菌種保存中心而言，此法難以被採用。冷凍乾燥法（圖一）是優良的菌種保存方法，能夠維持菌種的穩定性，通常適用於細菌、酵母菌及能產生孢子的黴菌，但對於只有菌絲而不會產孢的黴菌及菇類眞菌而言是不能適用的，因此凍乾法對於菇類眞菌來講是有限制的。而緣於精液及血液能成功地保存於液態氮中，啓發了眞菌或許也能利用此一方法來保存的構想。由於此種超低溫保存法能減少細胞內外的液態水而使許多生理作用不能進行，並能防止細胞核的分裂，使細胞發生變異之可能性降至最低，故對菌種中心保存菌種及相關研究來説是最重要的方法。

## 保存方法的基礎理念

導致基因重組和突變的有絲分裂，與細胞的分裂及代謝活力有關，一個理想的基因種原保存是應在代謝被不活化的狀態下，將活的菌體控制維持其活性，但能制止其細胞的分裂與停滯其生長，此一目標已用超低溫保存方法發展成功，並爲長期保存食用菇類的最好方法。在諸多的冷凍劑中，如液態空氣、氫、氦及氮中，以液態氮被認爲是最安全及最符經濟效益的。然而在超低溫凍化過程中，由於水分的傳送均經過細胞膜，冷凍時細胞內冰晶的形成刺傷胞膜和胞器與胞內溶質濃度增高，容易導致凍害，而控制適度的降溫速率將可提高細胞之存活率。爲能降低在凍結及解凍時所發生的冰晶傷害程度，採用適當的化學保護劑，可以減少冰晶的形成。目前已有很多的化學化合物曾被單獨或混合使用爲冷凍保存菌種的抗凍劑，這些抗凍劑能控制冰晶的大小及形成速率，能緩和溶質的濃度急速增高及增加細胞膜的水滲透性，並降低細胞內容物的凝結點，以利冷凍時細胞脱水的進行。抗凍劑有兩大類型，一爲浸入型，如甘油及DMSO等，此等溶液能滲入細胞内，而得以在胞内及胞外同時發揮其保護效果；二爲非浸入型，如糖類及PVP等，用於使胞内於冷凍時與水分子產生結構上的改變與細胞内溶質濃度的平衡，避免脱水過度。

理想之基因種原保存是制止細胞分裂及停滯其生長使其生理代謝完全停止活動。由於食用菇類絕大多數係以純菌絲生長，在培養基上極少產生孢子，所以，除了能形成節孢子或芽孢子之菌株外，均不適用凍乾保存。近二十年來已成功地使用超低溫保存法長期保存食用菇類菌種。其中液氮保存（圖二）係利用液氮液相 (-196℃) 及其氣相 (-150~-180℃) 的超低溫，使細胞內外的液態水減少而無法進行生理作用，同時抑制細胞核分裂，防止其變異。而細胞在冷凍解凍的過程中，常因溫度超過-139℃時所形成的冰晶對細胞造成傷害，以致影響其存活率。因此需配合冷凍解凍速率之控制及保護劑之添加，以減少細胞在液氮保存過程中損傷。目前已知以1℃／min 的速率緩慢降溫冷凍（圖三）及以37℃-40℃快速解凍法（圖四），並以10 %甘油或5 % DMSO作爲抗凍劑對大部份菇類保護效果較佳，因此液態氮被咸認是最好及最安定之長期保存食用菌的方法。由於使用冷凍乾燥法保存菇類菌種仍有困難，如欲有效地保存菌種原有之基因型及表現型之遺傳穩定性，則只能採用超低溫保存法保存之。經研究，絕大部份之菇類能以小米粒爲生長基質，10%甘油作爲抗凍劑，經1℃／min 降溫速率保存在-80℃冰櫃（圖五）及液態氮中，可維持相當高之存活率。一般抗凍劑以10 %甘油即可避免冰晶的形成造成細胞之傷害，但是甘油滲透速度慢，須靜置一段時間才能完全滲入，而滲透過久則又對某些菌會造成毒害。例如草菇於甘油中保存在4℃三週後，其存活率及生長速率普遍降低，即可能爲甘油對草菇菌體造成毒害之結果。而因滲透速度快且其菌種存活率優於甘油，5 % DMSO是相當好之抗凍劑，唯DMSO對人體毒性較大，所以較少爲學者所採用，但許多菌種仍需靠此一抗凍劑來保存菌株。

控制冷凍之降溫速率能使細胞外溶液凍結而細胞內不凍結，再由擴散的原理而導致細胞逐漸脱水至細胞外結冰，以防止胞內冰晶的形成對細胞造成胞膜的破裂，形態的改變等傷害，並抑制 RNA、DNA 的合成等。細胞質的冰點 (freezing point) 常大於-1℃，而且有超冷的現象 (supercooled)，即使細胞外的液體已結冰，而細胞內尚未凍結，此現象顯示細胞膜可防止外部冰晶進入超冷的內部，亦即細胞內不含有超冷的冰核。然而降溫速度若過於緩慢，細胞會因嚴重失水而造成胞內毒害，但若降溫速度太快，則易使得細胞內結冰而刺傷細胞，因此直接置入 -80℃及液態氮中保存，將會由於降溫速度太快而阻礙保存之效果。而快速解凍則因可以減少解凍過程中冰晶的再形成所對菌體造成的傷害，故以37-45℃快速解凍可以減少解凍時冰晶之再形成，而提高菌種的存活率。

圖一、冷凍乾燥保存法

圖二、液態氮超低溫保存法

圖三、緩慢冷凍儀

圖四、37℃水浴快速解凍

圖五、-80℃超低溫保存法

圖六、試管繼代培養(左)與液體石腊覆蓋(右)

# 保存方法概述

菇類菌種保存方法，大致上可分爲五種：繼代培養法、液體石腊覆蓋法、無菌水保存法、冷凍乾燥法、低溫保存法，其中繼代培養方法（圖六左）是一般人常用的方法，雖操作簡便，但容易產生變異而影響其原有的優良品性；經過滅菌的液體石腊覆蓋在菌種上面（圖六右），可阻隔空氣的水分散失，減緩空氣的進出，但菌體代謝仍照常進行，遺傳穩定性仍差；將菌體懸浮在無菌水上面，在冰箱冷藏可短時間保存菌種，這是較適合一般菇農實施的方法，唯同一菌株應以保存時間不超過半年爲限，否則變異仍將逐年明顯；冷凍乾燥保存方法是一種不會產生變異的方法之一，一般僅適用於產孢的黴菌，對於其他菇類菌種，則目前荷蘭眞菌保存中心 (CBS) 已初步試驗成功，利用雙糖之trehalose爲保護劑，將裂褶菌 (*Schizophyllum commune*) 及鬼傘 (*Coprinus psychromorbidus*) 冷凍乾燥後可以存活，但還不穩定，此方法仍有待更多的實驗，不過若能成功的話，則將使得菇類菌種之銷售及運輸達到相當的便利程度。

低溫保存法可分爲兩種，一爲 -20℃至 -135℃之間的保存，另一種爲超低溫液態氮保存【溫度介於 -150℃ (氣相)至 -196℃ (液相) 之間】。-20℃至-135℃之間的保存是靠冰箱冷凍保存，選擇適當的抗凍劑可保存兩三年，但由於冰箱會受到停電、機器的穩定性及開開關關溫度變化大等因素，使菌種容易受到外在因子的影響而導致死亡，因此必須時常測試其存活；而液態氮保存，不管是液相或氣相，溫度均低於-139℃，完全不受電力影響，是目前被公認世界上最佳的保存方法。食品工業發展研究所所有菇類菌種皆利用液氮法保存，除極少數比較敏感的菌株之外，其餘皆可妥善保存。例如木生菇中之香菇、金針菇、鮑魚菇、木耳、靈芝、茯苓等菌種保存在-80℃及液態氮時，以10 %甘油、10 %葡萄糖、10 %蔗糖及無菌水當抗凍劑時，在10 %甘油中能維持相當高的存活率；而草性菇中之洋菇及草菇於-80℃及液態氮保存，以不同抗凍劑保護，除草菇保存較差之外，不同品系的洋菇在保存上皆沒有問題。而利用此種超低溫保存與傳統之繼代培養方式保存後，對菌種菇體形成前菌絲生長期日數長短有顯著的影響，而且經人工栽培試驗比較其產量時，也很明顯可以看出液態氮保存的菌種有較高的產量。

（一）繼代培養法

1.選擇適當培養基，製成斜面試管，將菌種移植生長。

2.每一菌種最好培養5至10根試管。

3.每次更新培養基時，最好以適當培養基及營養條件差的培養基輪流替換，以減少因長期生長在營養成分高的培養基造成突變率增高或生理活性降低。例如夏季鮑魚菇可培養於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (PDA) 及麥芽糖抽出物培養基 (MEA) 或單純洋菜培養基 (WA) 。

4.隨時留意貯放期間是否受到污染，棉花塞試管應避免璊 的侵襲造成污染，若爲螺旋試管，則應留意管口是否因濕氣而有雜菌滋生。

5.若發現有老化、退化、污染等情形，應捨棄重新購入菌種，以免因污染或菌種活性退化而導致產量降低造成損失。

（二）液體石腊覆蓋法

1.選擇營養成份較低的培養基 (但也必須是菌株能生長良好的培養基) ，將菌種移植生長，直到長滿試管。

2.將已殺過菌的液體石腊油倒入試管內，拴上螺旋蓋子或塞入棉花塞。

3.於室溫中或4℃以上低溫保存。

4.保存期間應維持乾燥，以避免雜菌或昆蟲滋生。

5.以此方法保存應有備而不用的心態，萬一繼代培養保存菌種污染退化或其他方法發生問題時，才考慮自此菌種再活化，因爲石腊會阻礙生長以及保存過久菌種會老化而失去原有之特性。

（三）無菌水懸浮保存法

1.將菌種培養於試管或培養皿上。

2.將蒸餾水裝入三角燒瓶或試管內，殺菌備用。

3.取菌落外圍0.5公分以內的菌絲塊，約0.5公分見方大小，丟入無菌水內。

4.於冰箱冷藏室保存。

5.取用時直接將菌絲塊接入適當培養基即可。

備註：可將無菌水直接倒入試管內亦可 (培養皿不宜，因爲太寬容易污染) ，不過因爲培養基仍含有大量養分，菌體仍持續生長，老化現象比切塊置入無菌水還快，較不適採用。

（四）冷凍乾燥保存法

1.將已滅過菌的半透膜 (PT cellophane membrane) 鋪在培養基上，然後接入菌種，待菌絲長至直徑五至八公分。

2.撕下半膜透，將菌絲移入液體培養基，以果汁機打碎。

3.取菌絲片段懸浮液75 ml加入300 ml液體培養基，並以150 rpm振盪培養數天。

4.將菌絲團放入 300 $\mu$l，12 % 的 skimmed milk 中，此抗凍劑中須含有糖類，如trehalose即是一種很好的保護劑，然後以每分鐘 1℃緩慢冷凍至-70℃後，於眞空乾燥機中眞空乾燥至含水量低於5 %。

5.活化時將凍乾管打破，並將菌體懸浮於液體培養基中復水，此時可接種於洋菜培養基或直接在液體培養基中生長。

備註：存活率將隨凍乾程度而有不同，愈乾則保存期限愈長，但存活率愈低，反之含水量愈高存活率較高，但相對的保存期限愈短。

（五）超低溫保存法

1.將菌種接種於小米或洋菜培養基上，待長滿後取小米或洋菜塊。

2.將已長菌絲之小米或洋菜塊移入內含10 %甘油或 5 % DMSO之冷凍小管 (vial) 內，於4℃或室溫下靜置兩小時，使抗凍劑完全滲透進入菌體內。

3.以每分鐘 1℃緩慢冷凍至-70℃後，保存於-80℃或液態氮氣相中。

4.活化時將低溫保存管取出置於37-40℃之70 %酒精浴中迅速解凍，然後取出菌體移植入適當培養基上生長。

備註：某些較敏感的菌種可以考慮於抗凍劑中再加入糖類，將可提高其保存效果。

# 結　論

生物科技爲二十一世紀繼資訊科技產業興盛之後，最具發展與應用潛力的明星產業，其發展的基礎即爲具多樣性的微生物、植物和動物等生物資源，而此些遺傳資源中最具前景與開發潛力的，對剛要邁入已開發國家之林的台灣來說，本土性的生物資源就是我們最大的本錢。爲了能促成台灣生技產業之進步與提昇，有系統的收集與保存這些重要資源，便成爲我們這一代應戮力完成的使命。

由於菇類菌種的細胞核分裂速度快，且易受環境改變的影響，自然突變的機率大，若未能適當保存，常會發生退化及變異現象而失去其原有之優良特性而降低其品質及生產量，造成栽培者重大損失及食品市場來源不穩定之困擾。民間常用的礦物油保存雖可短時間保存菌種，具有防止污染及避免乾燥之優點，然其穩定性差，一旦寶貴的菌種發生突變或死亡，所造成的損失將無可彌補，所以必須要有一套完善的保存制度方是長久之計。

針對一般食用菇栽培種，如木耳、香菇、洋菇、金針菇、鮑魚菇等等菌種而言，在超低溫液態氮保存上皆沒有問題，可以毫無問題地長久保存，至於其他新興食用菇則視菌種而定，大致上也都沒有問題，若有保存上的困難情形發生則須再施以其他技巧及方法來加以保存。由於繼代培養、石腊油覆蓋及無菌水保存仍容易在短時間內發生老化及突變等不良情形，因此在栽培上仍建議於一年以內短時間施用，但就長遠考量，爲了達到出菇的品質與產量上的穩定，我們最好是以保存效果最佳的液態氮超低溫保存法來妥善保存我們的優良菌種。

# The mushroom spawns preservation technique

Wang B. C.[1,*]

[1]Southern Taiwan Service Center, Food Industry Research and Development Institute

[*]Corresponding author, E-mail：wbc@firdi.org.tw

## Abstract

The application value of edible and medicinal mushrooms is highly recommended, and its economic benefits also arouse people’s attention. However, mushroom growers and the industry have expressed recently that the quality and quantity of its production have decreased gradually. The main probability for causing this problem is due to poor preservation of mushroom culture considered as the core in production. It may lead to cultural contamination, mutation, recession, or even death. These are all fatal problems during production and need to be studied and solved thoroughly for preventing unnecessary economic losses on investments.

**Key words**：edible and medicinal mushrooms, culture, preservation